

รหัสโครงการ SUT3-304-52-24-17



รายงานการวิจัย

การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย
(Cloning and Expression of Phycocyanin from Cyanobacteria)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-52-24-17



รายงานการวิจัย

การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย (Cloning and Expression of Phycocyanin from Cyanobacteria)

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2552-2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2555

กิตติกรรมประกาศ

คณะนักวิจัย ขอขอบคุณ สภาวิจัยแห่งชาติ (วช) และ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้จัดสรรงบประมาณสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ กรุณาตรวจสอบ ให้ข้อเสนอแนะ ปรับปรุงแก้ไข รายงานวิจัยนี้ ทำให้รายงานวิจัยนี้ถูกต้องและครบถ้วนสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ได้ทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจและเริ่มทำงานกับสาหร่าย และ ไฟโคไซยานิน ขอขอบคุณ นายสุเมธ อัมสุนทรรักษา นางสาววันวิสาข์ สุภาพ ผู้ช่วยวิจัยที่ได้ช่วยเตรียมตัวอย่าง ร่วมมือในการดำเนินการวิจัยและช่วยสรุปผลการวิจัย ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของผู้วิจัย ดำเนินการไปได้เป็นอย่างดีและสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณนางสาว คาราวรรณ ร่วมกุศล ที่ได้ช่วยจัดพิมพ์ ต้นฉบับร่างรายงานการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

หัวหน้าโครงการ

มิถุนายน 2555

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะของยีนไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในระดับโมเลกุล โดยการโคลนยีนไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena siamensis* TISTR8012 ซึ่งเริ่มจากการสร้างนิวคลีโอไทด์สายสั้นจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ana. variabilis* ATCC 29413, *Arthrospira platensis*, *Spirulina maxima*, *Ana. kisseleviana*, *Ana. lemmermannii*, *Ana. flosaquae* และ *Ana. planktonica* จากนั้นทำการโคลนแอลฟา และบีตา-ไฟโคไซยานินโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วถ่ายโอนเข้าสู่โคลนนิ่งเวกเตอร์ แล้วถ่ายโอนเข้าสู่เวกเตอร์เพื่อการแสดงออกของโปรตีน เมื่อได้โปรตีนแอลฟา- และบีตา-ไฟโคไซยานิน จึงทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้โบบอลด์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี แล้วนำโปรตีนที่บริสุทธิ์แล้ว มาทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS scavenging ผลการทดลองที่ได้นำเสนอโดยค่า IC_{50} เปรียบเทียบกับวิตามินอีสังเคราะห์ โดยวิตามินอีสังเคราะห์ โปรตีนแอลฟา- และโปรตีนบีตา-ไฟโคไซยานิน ที่ทำบริสุทธิ์มีค่า IC_{50} 0.4, 13.8 และ 18.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Abstract

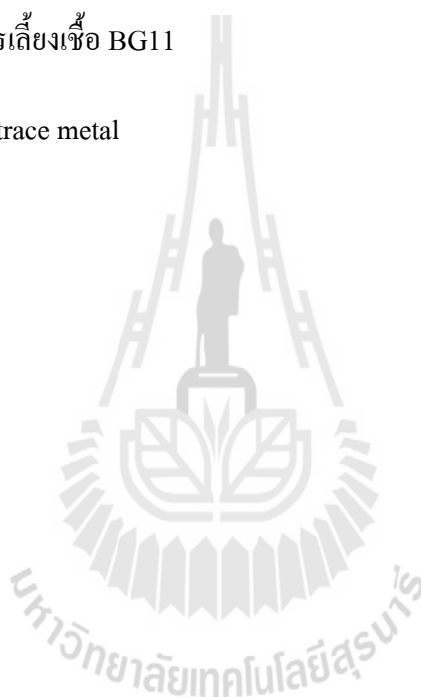
The objectives of this research are to clone, expressed, purified and study phycocyanin properties. Genomic DNA of *Anabaena siamensis* TISTR8012 was used as a template for apo- α^{PC} and apo- β^{PC} amplification. The primers for apo- α^{PC} and apo- β^{PC} amplification were designed from the alignment of apo- α^{PC} and apo- β^{PC} of *Ana. variabilis* ATCC 29413, *Arthrospira platensis*, *Spirulina maxima*, *Ana. kisseleviana*, *Ana. lemmermannii*, *Ana. flosaquae* and *Ana. planktonica*. The apo- α^{PC} and apo- β^{PC} genes were amplified and cloned into pGEM_T easy cloning vector and sequenced. Then, subcloned into pET32a expression vector. The recombinant proteins were expressed in BL21 (DE3) *Escherichia coli* host cells. The recombinant apo- α^{PC} and apo- β^{PC} fusion proteins were purified using cobalt affinity chromatography. The recombinant proteins were analyzed for antioxidant scavenging property using ABTS scavenging assay compare with synthetic vitamin E, trolox. The results showed that trolox, rTrx_apo- α^{PC} and rTrx_apo- β^{PC} proteins have the IC₅₀ value of 0.4, 13.8 and 18.6 mg/ml, respectively.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
การทบทวนวรรณกรรม	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
การออกแบบโปรแกรม	7
การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ	7
การโคลนยีนไฟโคไซยานิน	7
การแสดงออกของยีนไฟโคไซยานิน	8
การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์	9
การทดสอบคุณสมบัติไฟโคไซยานิน	9
บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	11
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม	23
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. คำมาตรฐานโปรตีน	26
ภาคผนวก ข. อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	27
ภาคผนวก ค ลำดับ DNA ที่ส่งไปยังฐานข้อมูล NCBI	29
ประวัติผู้วิจัย	31

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ไพเมอร์ ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนไฟโคไซยานิน	8
ตารางที่ 2 ผลการบ่งชี้ยีนไฟโคไซยานิน (<i>cpcA</i> และ <i>cpcB</i>) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI	14
ตารางที่ 3 ส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11	28
ตารางที่ 4 ส่วนผสมของ A5 trace metal	28



สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 จีโนมิกส์เอ็นเอที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>Anabaena siamensis</i> ที่ทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์	11
รูปที่ 2 ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์ที่ทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์	13
รูปที่ 3 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน (A): rTrx_ apo- α^{PC} และ (B): rTrx_ apo- β^{PC}	15
รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE การแสดงออกของโปรตีน (A): rTrx_ apo- α^{PC} และ (B): rTrx_ apo- β^{PC} ในเซลล์แบคทีเรีย <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเม็คโคบอลด์	16
รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE ของโปรตีน (A) rTrx_ apo- α^{PC} และ (B) rTrx_ apo- β^{PC} ที่ทำให้เข้มข้นขึ้น และ exchanged ด้วย 50 mM Tris-Cl, pH8.0 ใน 10 kDa cutoff	17
รูปที่ 6 การทำ DPPH scavenging assay	19
รูปที่ 7 ผลการทำปฏิกิริยา DPPH หลังจากเวลาผ่านไป 30 นาที	19
รูปที่ 8 วิธีการทดสอบแบบ ABTS scavenging	20
รูปที่ 9 แสดงค่ามาตรฐานโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	26

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือที่รู้จักกันในชื่อของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) เป็นแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ โดยใช้โปรตีนไฟโคบิลิน (phycobilin) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของไทลาคอยด์ (thylakoid) ทำงานร่วมกับคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) โปรตีนไฟโคบิลินนั้นนับว่าเป็นรงควัตถุที่สำคัญต่อการสังเคราะห์แสงซึ่งพบได้มากถึง 40-60 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ภายในเซลล์ โปรตีนไฟโคบิลินจะรวมตัวเพื่อสร้างเป็นกลุ่มของโปรตีนเรียกว่า ไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของการรวมกันระหว่างโปรตีนและกลุ่มธาตุที่ทำให้เกิดสีในสารประกอบ (chromoprotein) ทำหน้าที่สำคัญในการเป็นตำแหน่งของการสังเคราะห์แสง ในธรรมชาติโปรตีนไฟโคบิลินจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มตามคุณสมบัติในการเกิดสี ได้แก่ ไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) ให้สีได้ที่มีความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) ให้สีได้ที่มีความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และอัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) ให้สีได้ที่มีความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ซึ่งโปรตีนไฟโคบิลินแต่ละชนิดประกอบไปด้วยสายแอลฟา 1 สาย และสายบีตา 1 สาย ในสิ่งมีชีวิตโปรตีนไฟโคบิลินทำหน้าที่ในการดักจับพลังงานแสงตั้งแต่ความยาวคลื่น 500 ถึง 650 นาโนเมตร และทำการส่งต่อพลังงานแสงไปสู่คลอโรฟิลล์เอ โดยการส่งถ่ายพลังงานนั้นเริ่มจากการรับแสงของไฟโคอีริทริน จากนั้นส่งต่อไปที่ไฟโคไซยานิน แล้วส่งต่อไปให้กับอัลโลไฟโคไซยานิน และสุดท้ายส่งให้กับคลอโรฟิลล์เอ การส่งถ่ายพลังงานภายในโปรตีนไฟโคบิลินจะส่งจากสายบีตาไปให้กับสายแอลฟา

ไฟโคไซยานินนอกจากเป็นรงควัตถุที่สำคัญต่อการสังเคราะห์แสงแล้ว ไฟโคไซยานินยังมีคุณสมบัติหลากหลายทั้งเรื่องของการต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ และการเป็นสารเรืองแสง โดยไฟโคไซยานินจะไปโปรตีนมี คุณสมบัติ ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการบวม ส่วนไฟโคไซยานินไฮโด

โปรตีนที่เกิดจากการรวมตัวของไฟโคไซยานินอะโปโปรตีนกับคลอโมฟลอร์ด้วยพันธะไทโออีเทอร์ตรงบริเวณซิสทีโอนจะเป็นสารประกอบฟลูออเรสเซนต์สีน้ำเงิน

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา บีตา และ แอลฟาไฟโคไซยานิน โอเปอร็อนจาก *Anabaena siamensis* TISTR 8012 โดย โคลน ผลิต และการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ แล้วทำการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 โคลนยีนที่มีการแสดงออกของโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย
- 1.2.2 ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนไฟโคไซยานินใน *Escherichia coli* เพื่อเป็นการยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีนไฟโคไซยานินแทรกอยู่ เมื่อถ่ายเข้าสู่ *E. coli* ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าโปรโมเตอร์สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนไฟโคไซยานินที่มาจากไซยาโนแบคทีเรีย
- 1.2.3 ทำการแยกโปรตีนไฟโคไซยานินที่ผลิตได้ และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์
- 1.2.4 ทำการทดสอบคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ เพื่อยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนไฟโคไซยานินที่ผลิตได้นั้นสามารถทำงานได้จริง

1.3 ขอบเขตของงาน

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการโคลน การผลิต และการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์แก่ บีตา และแอลฟา โอเปอร็อนจาก *Anabaena siamensis* และไฟโคไซยานินโฮโลโปรตีนเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยผู้วิจัยทำการศึกษา และสร้างองค์ความรู้ในการผลิต และทำให้บริสุทธิ์ กระทั่งทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ

1.4 การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ไซยาโนแบคทีเรีย เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มของโพรคาริโอตที่มีชีวิตมาตั้งแต่ก่อนสมัยจะก่อกำเนิดสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในโลก และเป็นสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดการมีก๊าซออกซิเจนขึ้นในชั้นบรรยากาศของโลก ไซยาโนแบคทีเรียสามารถอาศัยในสภาวะที่หลากหลาย เช่น อุณหภูมิอบอุ่น บริเวณที่มีแสงสว่างมาก และบริเวณที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ จึงทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถมีชีวิตได้ในสภาวะที่หลากหลาย เช่น อากาศร้อนในฤดูใบไม้ผลิ ทะเลสาบที่มีอุณหภูมิต่ำ และในดิน มีเพียงไม่กี่สายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียเท่านั้นที่มีชีวิตอยู่บริเวณมหาสมุทรเปิด โคลนบริเวณปากอ่าว บริเวณน้ำตื้น ทะเลสาบ และแม่น้ำ เรามักจะรู้จักไซยาโนแบคทีเรียในชื่อของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ในการศึกษาเรื่องของส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียทำให้ทราบว่า ไซยาโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ ประกอบด้วย เยื่อหุ้มเซลล์ 3 ชั้นด้วยกัน ได้แก่ เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ชั้นเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งค่อนข้างหนาจึงใช้ส่วนนี้ในการจำแนกไซยาโนแบคทีเรียออกจากแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป และชั้นสุดท้ายคือเยื่อหุ้มพลาสมา (plasma membrane) (Christa และคณะ 2005) ในปี ค.ศ.1979 Rippka และผู้ร่วมวิจัยได้ทำการจำแนกไซยาโนแบคทีเรียตามลักษณะออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้ (Rippka และคณะ 1979)

กลุ่มที่ 1 ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวมีการแพร่พันธุ์แบบการแบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 เซลล์ หรือการแตกหน่อ ได้แก่ *Synechococcus* Type I II III, *Gloeotheca*, *Gloeocapsa*, *Gloeobacter*, *Chanaesiphon* และ *Synechocystis* Type I II

กลุ่มที่ 2 ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวมีการแพร่พันธุ์แบบการแบ่งตัวมากกว่าครั้งละ 2 เซลล์ ได้แก่ *Dermocarsa*, *Xenococcus*, *Dermocarpella*, *Chroococcidiopsis*, *Pleurocapsa* group Type I II และ *Myxosarcina*

กลุ่มที่ 3 ไชยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเส้นใย ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิส และมีการแพร่พันธุ์โดยแบ่งตัวเป็นระยะนาบได้เพียงครั้งละ 1 ระยะนาบ ได้แก่ *Spirulina*, *Arthrospira*, *Oscillatoria*, *Pseudonabaena*, and LPP group A B และ *Plectonema baryanum* type

กลุ่มที่ 4 ไชยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเส้นใย มีเซลล์เฮเทอโรซิส และมีการแพร่พันธุ์โดยแบ่งตัวเป็นระยะนาบได้เพียงครั้งละ 1 ระยะนาบ ได้แก่ *Anabaena*, *Nodularia*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix* และ *Tolypothrix tenuis* type

กลุ่มที่ 5 ไชยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเส้นใย มีเซลล์เฮเทอโรซิส และมีการแพร่พันธุ์โดยแบ่งตัวเป็นระยะนาบได้มากกว่าครั้งละ 1 ระยะนาบ ได้แก่ *Chlorogloeopsis fritschii* และ *Fischerella*

ในการทำวิจัยในครั้งนี้ได้เลือกไชยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเส้นใย มีเซลล์เฮเทอโรซิส และมีการแพร่พันธุ์โดยแบ่งตัวเป็นระยะนาบได้เพียงครั้งละ 1 ระยะนาบ เนื่องจากมีการแบ่งตัวที่รวดเร็ว และโด่ง่ายทำให้สามารถเลี้ยงไชยาโนแบคทีเรียเพียงระยะเวลาอันสั้นแต่ได้จำนวนเซลล์มากมาย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 เป็นไชยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นใย และมีการสร้างเซลล์เฮเทอโรซิส ซึ่งเซลล์เฮเทอโรซิสนี้เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการตรึงก๊าซไนโตรเจน ภายใต้สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจนเซลล์ปกติจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เฮเทอโรซิส เพื่อทำการตรึงก๊าซไนโตรเจนให้ไชยาโนแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Kaneko และคณะ 2001) โดย *A. siamensis* ค้นพบครั้งแรกในนาข้าวของประเทศไทย ซึ่งในปัจจุบันสายพันธุ์นี้นิยมนำมาใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพสำหรับใช้ในนาข้าว ซึ่งสามารถให้ผลผลิตที่ใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยเคมี อีกทั้งไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Phunprunch และคณะ 2006)

ในส่วนต่อไปจะได้กล่าวถึงส่วนประกอบของโปรตีนไฟโคบิลิน (phycobiliproteins) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง จะพบได้ในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในของไทลาคอยด์ (thylakoid) (Yu และคณะ 1981) โดยโปรตีนไฟโคบิลิน คือ โปรตีนที่ทำงานร่วมกับคลอโรฟิลล์ (chromophore) โดยส่วนมากพบในชั้นไทลาคอยด์ โปรตีนไฟโคบิลินนี้นับว่าเป็นรงควัตถุที่สำคัญต่อการสังเคราะห์แสงซึ่งพบ

ได้มากถึง 40-60 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ภายในเซลล์ (Pilot และ Fox 1984) โปรตีนไฟโคบิลินจะรวมตัวเพื่อสร้างเป็นกลุ่มของโปรตีนเรียกว่า ไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของการรวมกันระหว่างโปรตีนและกลุ่มธาตุที่ทำให้เกิดสีในสารประกอบ (chromoprotein) (Lorimier และคณะ 1984) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการเป็นตำแหน่งของการสังเคราะห์แสง ในธรรมชาติโปรตีนไฟโคบิลินจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มตามคุณสมบัติในการเกิดสี ได้แก่ ไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) สามารถให้สีได้ที่มีความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) สามารถให้สีได้ที่มีความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และอัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) สามารถให้สีได้ที่มีความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ซึ่งโปรตีนไฟโคบิลินแต่ละชนิดประกอบไปด้วย สายแอลฟา 1 สาย และสายบีตา 1 สาย ในสิ่งมีชีวิตโปรตีนไฟโคบิลิน ทำหน้าที่ในการดักจับพลังงานแสงตั้งแต่ความยาวคลื่น 500 ถึง 650 นาโนเมตร และทำการส่งต่อพลังงานแสงไปสู่คลอโรฟิลล์เอ (Liu และคณะ 2005) โดยการส่งถ่ายพลังงานนั้นเริ่มจาก การรับแสงของไฟโคอีริทริน จากนั้นส่งต่อไปที่ไฟโคไซยานิน จากนั้นส่งต่อไปให้กับอัลโลไฟโคไซยานิน และสุดท้ายส่งให้กับคลอโรฟิลล์เอ การส่งถ่ายพลังงานภายในโปรตีนไฟโคบิลินจะส่งจาก สายบีตาไปให้กับสายแอลฟา (Romay และคณะ 2003) ในงานวิจัยครั้งนี้จะให้ความสำคัญไปที่ไฟโคไซยานิน เนื่องจากมีคุณสมบัติหลากหลายทั้งเรื่องของการต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ และการเรืองแสง

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

สามารถเริ่มต้นการเป็นส่วนหนึ่งของ การสร้างระบบเทคโนโลยีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนไฟโคไซยานิน นอกจากนี้ โปรตีนไฟโคไซยานินที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วได้ถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น จึงเป็นการเพิ่มความรู้เกี่ยวกับการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ

งานวิจัยนี้ได้เป็นส่วนหนึ่งในการผลิตนักศึกษาปริญญาโท 1 คน บางส่วนของงานวิจัยนี้ได้นำเสนอ ในการประชุมวิชาการระดับ ชาติ และนานาชาติ เพื่อให้เกิดองค์ความรู้แก่ ประชาชน นักเรียน นักศึกษา ครู อาจารย์ นักวิชาการ ได้ศึกษาเพื่อเป็นความรู้พื้นฐานหรือนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยอื่น ๆ ต่อไป

Suphap, W., and Ketudat-Cairns, M. (2009) Phycocyanin alpha and Beta subunits of *Anabaena siamensis* TISTR8012 Proceeding of the The 2nd SUT Graduate Conference 2009 , Nakhon Ratchasima Thailand, January 21-22, 2009

Suphap, W., Charoenrat, T. and Ketudat-Cairns, M. (poster presentation) Cloning and expression of Phycocyanin from Cyanobacteria Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology “Biotechnology for Global Care” Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand October 14-17, 2008. ***

Poster award***

จากการโคลนยีนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงได้ส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าตีพิมพ์ยังฐานข้อมูล NCBI 2 ข้อมูลดังนี้

- *Anabaena siamensis* TISTR 8012 phycocyanin beta subunit gene, complete cds
519 bp linear DNA Accession:EU815328.1 GI:194271298
- *Anabaena siamensis* TISTR 8012 phycocyanin alpha subunit gene, complete cds
492 bp linear DNA Accession:EU815327.1 GI:194271296

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การออกแบบไพรเมอร์ (primer design)

ข้อมูลลำดับเบสของยีนไฟโคไซยานิน และ ลำดับโปรตีนจาก *Anabaena* sp. PCC 7120 ตาม Accession number X05239 ใน GenBank (NCBI) ถูกใช้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ และ ลำดับโปรตีนต้นแบบ จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับโปรตีนในสายรหัสสีเขียวแกนน้ำเงินอีก 7 สายพันธุ์ (*Ana. variabilis* ATCC 29413, *Arthrospira platensis*, *Spirulina maxima*, *Ana. kisseleviana*, *Ana. lemmermannii*, *Ana. flos-aquae* and *Ana. planktonica*) เพื่อนำไปทำการออกแบบไพรเมอร์และใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งส่วนที่เป็นสายแอลฟา และสายบีตา

2.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA extraction)

ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena siamensis* TISTR 8012 ถูกเลือกมาใช้ในการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยทำการเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ดังกล่าวตามขั้นตอนของ Golden และคณะ (1988)

2.3 การโคลนยีนไฟโคไซยานิน (Cloning phycocyanin gene)

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนไฟโคไซยานินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้จีโนมิก ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ส่วนไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อยีนไฟโคไซยานิน (ตารางที่ 1) จากนั้นทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นส่วนของยีนไฟโคไซยานินเข้ากับเวกเตอร์ (pENTR directional TOPO Cloning Vector) แล้วถ่ายโอนพลาสมิดนี้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อการเพิ่มปริมาณพลาสมิด

จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดนี้โดยคัดเลือกจากการต้านยาปฏิชีวนะตามที่เหมาะสม

จากนั้นเป็นขั้นตอนการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันว่ามีชิ้นยีนไฟโคไซยานินแทรกอยู่ภายในพ

ลาสมิดจริง โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

ตารางที่ 1 ไพเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนไฟโคไซยานินแอลฟา และบีตา

Primer name	Sequence	Tm (°C)
Phyco_beta_F	CAC CAT GAC ATT AGA CGT ATT TAC	48
Phyco_beta_R	TTA ACC AAC AGC AGC AGC GC	62
Phyco_alpha_F	CAC CAT GGT TAA AACCCC CAT TAC	57
Phyco_alpha_R	CAT GCT GAG AGG GTT GAT AGC G	56

2.4 การแสดงออกของยีนไฟโคไซยานิน (Expression phycocyanin gene)

เมื่อได้ยีนไฟโคไซยานินที่ถูกต้องซึ่งบรรจุอยู่ในโคลนนิ่งพลาสมิดแล้ว ทำการย้ายชิ้นส่วนยีนไฟโคไซยานินไปยังเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออก (expression vector) ด้วย LR clonase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย้ายชิ้นยีนไฟโคไซยานินไปยัง pET32a DEST เพื่อใช้ในการแสดงออก แล้วทำการถ่ายโอนพลาสมิดดังกล่าวเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ซึ่งพลาสมิด ดังกล่าวนี้นี้จะมีพอลิฮิสทีดิน (His tag) เชื่อมอยู่ที่ปลายคาร์บอกซิลิกของโปรตีนที่ผลิตได้ ทั้งนี้เพื่อให้ง่ายต่อการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (chromatography column) และใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) ระหว่างสารตัวอย่างกับลิแกนด์ (ligand) เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดจะสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) โคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื่อดังกล่าวจะถูกนำมา

ตรวจสอบความถูกต้องด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์ (colony PCR) เพื่อหาโคโลนีที่ให้ผลเป็นบวก จากนั้นนำมาทดสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน แล้วทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มียีนไฟโคไซยานินแทรกอยู่เป็นชุดควบคุม ในการศึกษาการแสดงออกของยีนเริ่มด้วยการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ในอาหารเหลว (LB broth) ที่เติมแอมพิซิลิน จากนั้นเลี้ยงให้ได้ค่าความขุ่น (optical density) ประมาณ 0.5-0.6 แล้วทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินด้วยตัวเหนี่ยวนำ (isopropylthiogalactoside; IPTG) ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม และใช้เวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระต่อไป

2.5 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์

แยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการโครมาโตกราฟีสัมพรรคภาพชนิดไอแมก (immobilized metal affinity chromatography; IMAC)

2.6 การทดสอบคุณสมบัติไฟโคไซยานิน (Phycocyanin property test)

ทำการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ 2 วิธี คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Davi และคณะ (2008) ซึ่งวิธีการ DPPH จะทำการผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน 40 ไมโครลิตร กับสารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และนำมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox (10-50 mg/l) ส่วนวิธี ABTS ทำโดยผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน 40 ไมโครลิตร กับสารละลาย ABTS

3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 6 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox (10-50 mg/L)

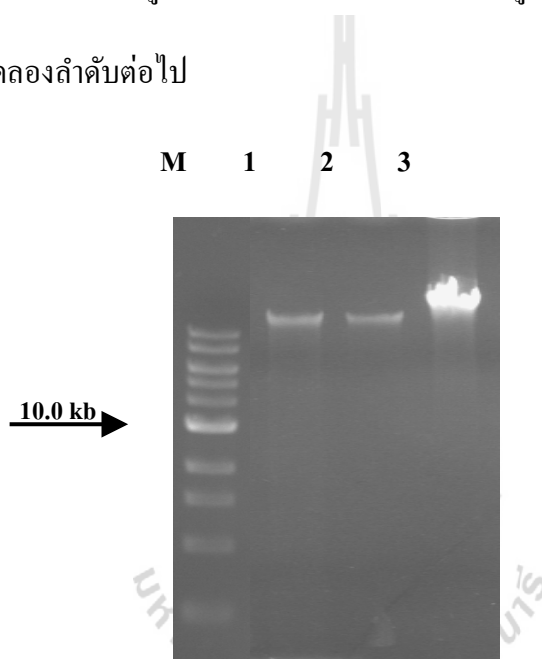


บทที่ 3

ผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (DNA extraction)

จากการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena siamensis* จีโนมิคดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาตรวจสอบด้วยการไหลคบน 1 เปอร์เซ็นต์ เจลอะกาโรส (agarose gel) พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดที่มากกว่า 10 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยจีโนมิคดีเอ็นเอนี้จะถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับเทคนิคพีซีอาร์ในการทดลองลำดับต่อไป



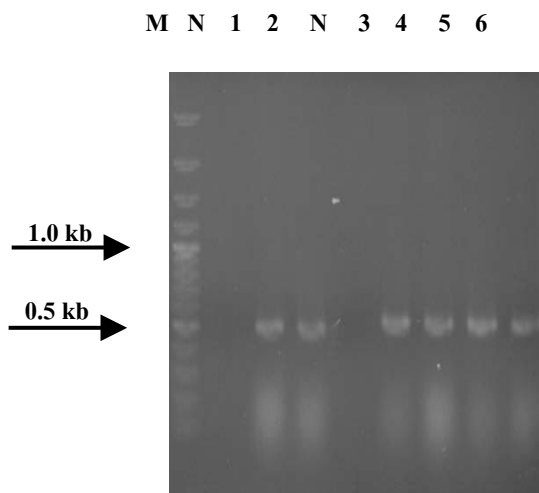
รูปที่ 1 จีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena siamensis* ที่ทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (M: 1 kb marker; 1-3: จีโนมิคดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ 1-3 ตามลำดับ)

3.2 การโคลนยีนไฟโคไซยานิน (Cloning phycocyanin gene)

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนไฟโคไซยานินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะดังแสดงในตารางที่ 1 และใช้จีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการข้างต้นเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และเมื่อทำการ

ตรวจสอบบนเจลอะกาโรสพบว่าชิ้นยีนบีต้าและแอลฟามีขนาด 500 และ 480 คู่เบส (base pair: bp) ตามลำดับ จากนั้นแยกดีเอ็นเอที่พบบนเจลอะกาโรสถูกตัดเพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทดสอบ (DNA extraction kit; Invitrogen) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้มาทำการเคลื่อนย้ายเข้าสู่เวกเตอร์ pENTR/D-TOPO แล้วทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α แล้วทำการตรวจสอบเบื้องต้นโคโลนีที่คาดว่าจะมีชิ้นยีนไฟโคไซยานินอยู่ด้วยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB แบบแข็งที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin (50 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิกรัม) ผสมอยู่ด้วย

โคโลนีที่พบเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ถูกนำมาทดสอบในขั้นต่อมาด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์ ซึ่งผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 2 จากนั้นเมื่อได้โคโลนีที่ถูกต้องโดยการตรวจสอบด้วยวิธีการเบื้องต้นดังกล่าวแล้ว จำนวนโคโลนีที่มีชิ้นยีนแอลฟาไฟโคไซยานิน 2 โคลน และยีนเบต้าไฟโคไซยานิน 4 โคลน ถูกส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท แมโครเจน ประเทศเกาหลี (Macrogen Inc., Korea) ซึ่งจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวพบว่าทั้ง 2 โคลน ที่มียีนแอลฟาไฟโคไซยานินมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Ana. variabilis* ATCC 29431 (CP000177) *Anabaena* sp. PCC7120 (AF18757) และ *Anabaena* sp. 7120 biliprotein (X05239) เป็น 87 85 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนโคลนทั้ง 4 ที่มียีนเบต้าไฟโคไซยานินมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Ana. variabilis* ATCC 29431 (CP000177) *Anabaena* sp. 7120 biliprotein (X05239) และ *Anabaena* sp. PCC7120 (AF18757) เป็น 90 88 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลของการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ที่ได้กล่าวมาทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งยีนแอลฟาไฟโคไซยานินและเบต้าไฟโคไซยานินได้ส่งไปเก็บไว้ในฐานข้อมูลที่ NCBI และได้รับรหัส (accession number) เป็น EU815327 และ EU815328 ตามลำดับ (ภาคผนวก ก)



รูปที่ 2 ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคโคโลนีพีซีอาร์ที่ทดสอบและวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส 2
 เปอร์เซ็นต์ (M: 100bp marker; 1-2: ดีเอ็นเอของยีนแอลฟาไฟโคไซยานิน (*cpcA* gene) ขนาด 480bp
 โคโลนีที่ 1-2 ตามลำดับ; 3-6: ดีเอ็นเอของยีนเบต้าไฟโคไซยานิน (*cpcB* gene) ขนาด 500bp โคโลนี
 ที่ 3-6 ตามลำดับ; N: negative control)

3.3 การแสดงออกของยีนไฟโคไซยานิน (Expression phycocyanin gene)

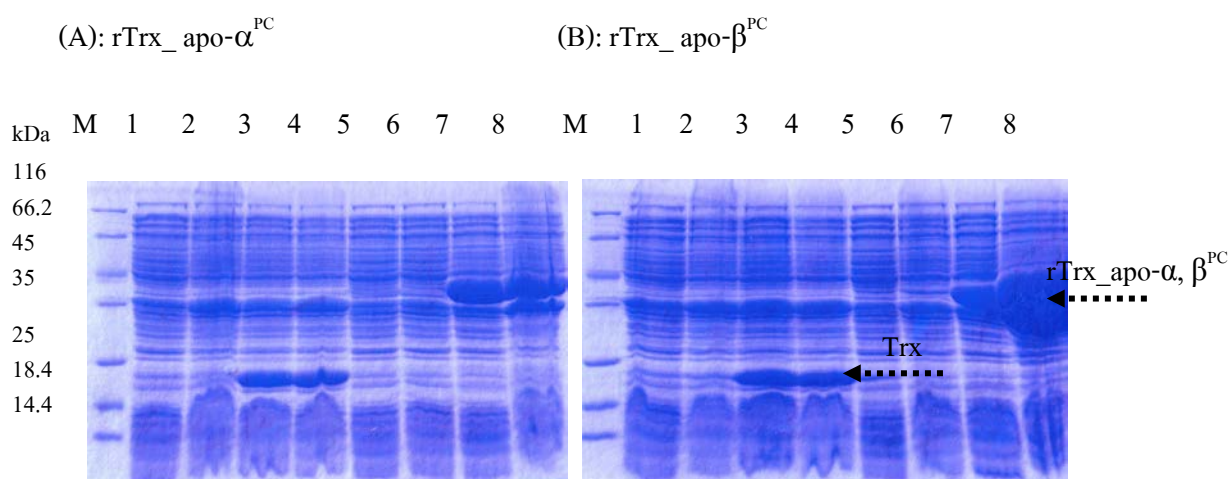
การแสดงออกของยีนไฟโคไซยานินในเซลล์ BL21 (DE3) pLysS ผลที่ได้พบว่าโปรตีนที่แสดง
 ออกมาโดยส่วนมากจะอยู่รวมกันในรูปแบบที่ไม่ละลาย (insoluble aggregation form) ซึ่งได้ทำการเพิ่ม
 ความสามารถในการละลายของโปรตีนนี้ด้วยการลดอุณหภูมิในการกระตุ้นการผลิตโปรตีน โดยในการ
 ทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณโปรตีนที่อยู่ในรูปแบบไม่ละลาย
 (insoluble form) ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ระยะเวลา และปริมาณ
 ตัวกระตุ้น (IPTG) ที่ใช้ในการกระตุ้นการผลิตโปรตีน ยังถูกนำมาพิจารณาด้วยเช่นกัน โดยพบว่าโปรตีนจะ
 ถูกผลิตขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง และตัวกระตุ้น IPTG ที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ จะ
 สามารถกระตุ้นให้ผลิตโปรตีนได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวกระตุ้นที่ความเข้มข้นอื่นที่ใช้ในการ
 ทดลองนี้ ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งโปรตีนที่ผลิตได้ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยจากรูปที่ 3 จะเห็นว่า

โปรตีนเป้าหมาย (target protein) มีขนาดที่แสดงบนเจล SDS-PAGE คือ 39 kDa และ 40 kDa ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน rTrx_apo- α^{PC} และ rTrx_apo- β^{PC} ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการบ่งชี้ยีนไฟโคไซยานิน (*cpcA* และ *cpcB*) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เปรียบเทียบกับ

ข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI

Accession	Description	Max Identity
<i>cpcA</i> gene		
CP000117	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29431	87%
AF178757	<i>Anabaena</i> PCC7120 phycobilisome rod structure	85%
X05239	<i>Anabaena</i> 7120 biliprotein phycocyanin operon	85%
CP002059.1	' <i>Nostoc azollae</i> ' 0708, complete genome	83%
M75599.1	<i>Fischerella</i> sp. Cohn	77%
AF333175.1	<i>Synechococcus vulcanus</i> C-phycocyanin alpha subunit gene	77%
JF798344.1	<i>Dolichospermum flos-aquae</i> FACHB 245	77%
<i>cpcB</i> gene		
CP000117	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29431	90%
X05239	<i>Anabaena</i> 7120 biliprotein phycocyanin operon	88%
AF178757	<i>Anabaena</i> PCC7120 phycobilisome rod structure	88%
BA000019	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 DNA, complete genome	88%
AF068771	<i>Synechocystis</i> PCC9413 beta-phycocyanin (<i>cpcB</i>)	83%
DQ848352	<i>Fremyella diplosiphon</i> Fd33 phycobilisome linker-core	82%
X07012	<i>Tolypothrix</i> sp. PCC7602 inducible <i>cpcB2</i> and <i>cpcA1</i>	77%

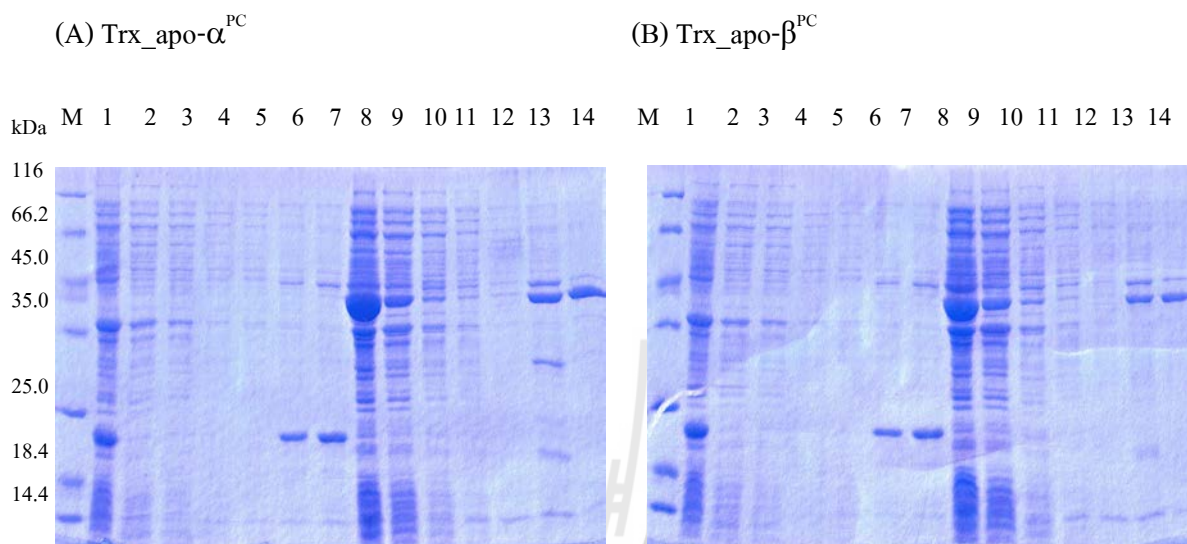


รูปที่ 3 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน (A): rTrx_ apo- α^{PC} และ (B): rTrx_ apo- β^{PC} ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ด้วยวิธี SDS-PAGE M: Protein standard (Fermentas); 1-2: ส่วนที่ละลาย (soluble fraction) และส่วนที่ไม่ละลาย (insoluble fraction) ของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์เปล่า (ไม่มีชิ้นยีน) และไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IPTG; 3-4 ตามลำดับ: ส่วนที่ละลายและส่วนที่ไม่ละลายของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์เปล่า (ไม่มีชิ้นยีน) และถูกกระตุ้นด้วย IPTG ตามลำดับ; 5-6: ส่วนที่ละลายและส่วนที่ไม่ละลายของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีน และไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย IPTG ตามลำดับ; 7-8: ส่วนที่ละลาย และส่วนที่ไม่ละลายของตัวอย่างเซลล์ที่มีเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีน และถูกกระตุ้นด้วย IPTG ตามลำดับ.

3.4 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์

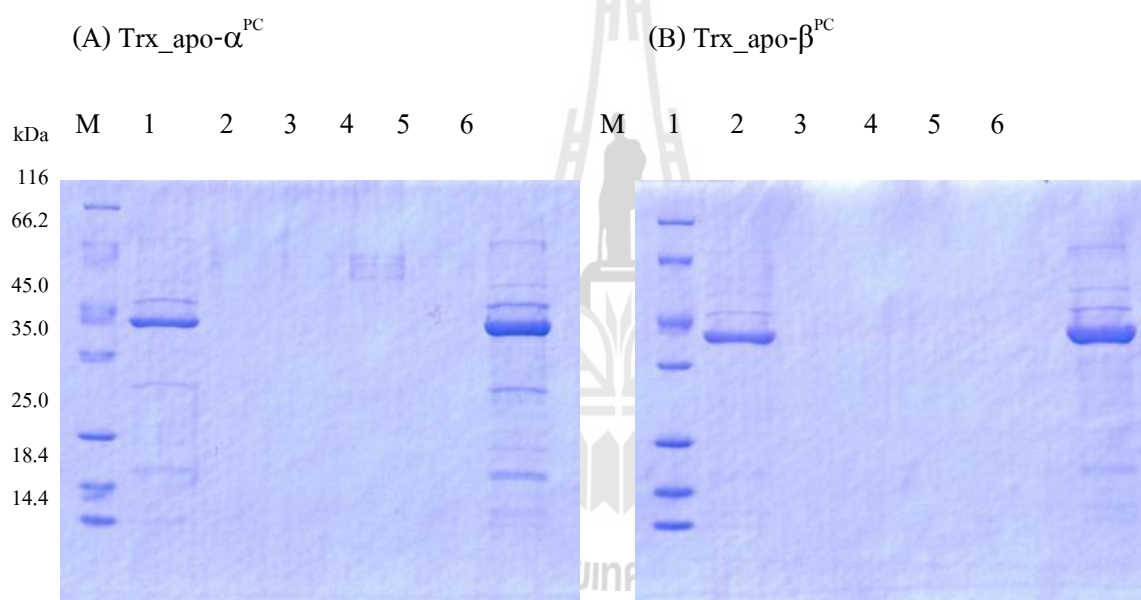
จากการออกแบบให้โปรตีนเป้าหมายมีส่วนเชื่อมต่อที่แตกต่างกัน คือ โปรตีน rTrx_ apo- α^{PC} จะมีส่วนเชื่อมต่อ 6XHis-tag ทั้งฝั่ง N และ C กับโปรตีน ขณะที่โปรตีน rTrx_ apo- β^{PC} จะมีส่วนเชื่อมต่อ 6XHis-tag แค่ฝั่ง N ของโปรตีนเท่านั้น ซึ่งจากการออกแบบนี้อาจทำให้ส่งผลต่อการจับกับไอออน โคบอลต์บนตัวกลางดูดซับแบบสัมพรรคภาพในกระบวนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยโปรตีน rTxn_ apo- α^{PC} จะจับกับ

ไอออนโคบอลต์บนตัวกลางดูดซับแบบสัมพรรคภาพได้ดีกว่าโปรตีน rTxn_apo- β^{PC} จึงทำให้ได้ปริมาณโปรตีนที่มากกว่าดังจะเห็นได้จากรูปที่ 4A และ 4B (ช่องที่ 14)



รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE การแสดงออกของโปรตีน (A): rTxn_apo- α^{PC} และ (B): rTxn_apo- β^{PC} ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพชนิดไอแมกที่มีกรดไอออนโคบอลต์ (M: Protein standard (Fermentas); 1-7: ตัวอย่างที่มีเวกเตอร์เปล่า (ไม่มีชิ้นยีน); 8-14: ตัวอย่างที่มีเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีน; 1, 8: ส่วนที่ละลาย (soluble fraction); 2, 9: ส่วนที่ไหลผ่าน (flow-through); 3-5: ส่วนที่ถูกล้าง (wash fraction) ด้วยอิมิดาโซล (imidazole) ความเข้มข้น 0, 5, และ 10 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ; 6: ส่วนที่ถูกชะ (elution fraction) ด้วยอิมิดาโซลความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์; 7: ส่วนชะที่ไม่ได้จับกับเม็ดโคบอลต์ด้วยอิมิดาโซลความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์; 10-13: ส่วนที่ถูกล้าง (wash fraction) ด้วยอิมิดาโซล (imidazole) ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 150 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ; 14: ส่วนที่ถูกชะ (elution fraction) ด้วยอิมิดาโซลความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์).

จากรูปที่ 4 ชี้ให้เห็นว่าที่ค่าอิมิดาโซลความเข้มข้นต่ำๆ (5, 10 และ 150 มิลลิโมลาร์) นั้น ไม่สามารถชะเอารีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) ออกจากตัวดูดซับแบบสัมพรรคภาพที่มีไอออนโคบอลต์ได้ (แถวที่ 4-6 และ แถวที่ 11-13) สำหรับค่าอิมิดาโซลที่ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ จะถูกใช้ในการชะไรโอรีดอกซิน (thioredoxin; Trx) ขณะที่รีคอมบิแนนท์โปรตีนจะต้องใช้อิมิดาโซลความเข้มข้นถึง 500 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในช่องที่ 14 ซึ่งหลังจากผ่านกระบวนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์แล้ว โปรตีนจะถูกนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นและละลายอยู่ใน 50 mM Tris-Cl, pH8.0 โดยจากรูปที่ 5 จะเห็นว่าโปรตีนมีความเข้มข้นมากขึ้น



รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE ของโปรตีน (A) rTrx_apo- α^{PC} และ (B) rTrx_apo- β^{PC} ที่ทำให้เข้มข้นขึ้น และ เปลี่ยนบัฟเฟอร์เป็น 50 mM Tris-Cl, pH 8.0 โดย 10 kDa cutoff (M: Protein standard (Fermentas); 1: ส่วนที่ถูกชะด้วยอิมิดาโซลความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์; 2-5: ส่วนที่ผ่านการกรอง (Filtrated fraction) เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาทีตามลำดับ; 6: รีคอม-บิแนนท์โปรตีนที่ผ่านการทำให้เข้มข้นแล้วที่ละลายอยู่ใน 50 mM Tris-Cl pH 8.0).

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ ถึงแม้ว่าโปรตีนนั้นจะไม่เรืองแสงก็ตาม แต่จากหลายๆ รายงานเมื่อไม่นานมานี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกร่วม (co-

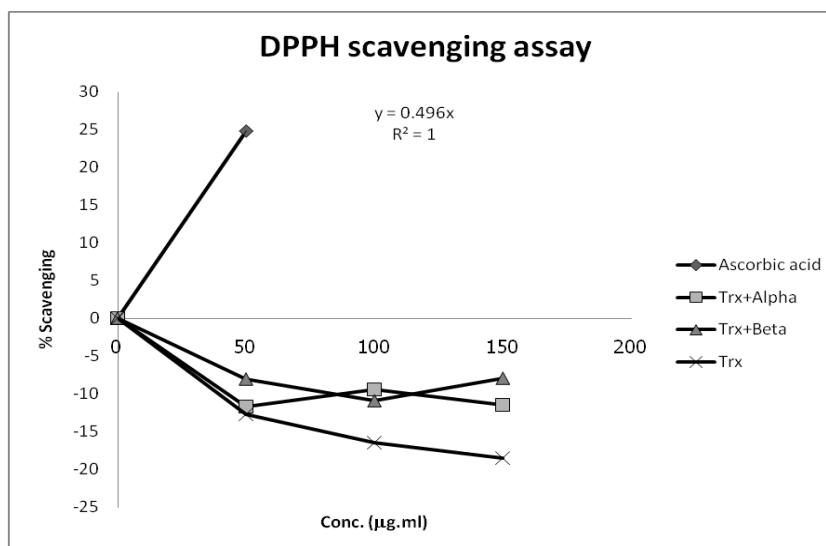
expression) ของหลายๆ ทรานยีน (transgene) ที่เป็นไฟโคไซยานินส่วน holo- α -subunit ของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกในเซลล์ *E. coli* นั้นสามารถเรืองแสงได้ (Tooley และคณะ 2001, Guan และคณะ 2007, Guan และคณะ 2009)

3.5 การทดสอบคุณสมบัติไฟโคไซยานิน (Phycocyanin property test)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการวัด DPPH scavenging activity ด้วยการประมาณค่าของ IC_{50} ได้ค่าประมาณ 0.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังรูปที่ 6 ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากความสามารถในการละลายในบัฟเฟอร์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในกระบวนการทดลองเกิดการตกตะกอน และเป็นสีขาวขุ่น หลังจากเวลาผ่านไป 30 นาที ซึ่งจะไปรบกวนการดูดกลืนแสง แสดงดังรูปที่ 7 การทดลองนี้จึงไม่สามารถใช้เทคนิคการวัด DPPH scavenging activity ของรีคอมบิแนนท์แอลฟา และ บีตาโปรตีนได้

จึงเปลี่ยนมาวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิค ABTS radical scavenging assay จากผลทดลองของ ABTS radical scavenging assay แสดงให้เห็นว่าโทรลอกซ์ (trolox) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมแสดงค่า IC_{50} เป็น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 8A) และ โปรตีนทดสอบ rTrx_apo- α^{PC} , rTrx_apo- β^{PC} และ Trx แสดงค่า IC_{50} เป็น 13.8, 18.6 และ 23.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 8B)

ซึ่งจากงานวิจัยของ Madhyastha และคณะ (2009) ชี้ให้เห็นว่า ซี-ไฟโคไซยานิน ตามธรรมชาติจากเซลล์ *Spirulina platensis* มีค่า scavenging DPPH radical เป็น 12 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถ scavenging ABTS radical ได้ อย่างไรก็ตาม ซี-ไฟโคไซยานิน ตามธรรมชาติสามารถเกิดความผิดพลาดต่อ scavenging ABTS radical อย่างมีนัยสำคัญได้เช่นกัน ในความแตกต่างระหว่างวิธีการทดสอบของ ABTS และ DPPH scavenging อาจเกิดจากความแตกต่างที่เกิดขึ้นในแต่ละปฏิกิริยา โดย ABTS เกิดในขั้นตอนที่เป็นของเหลว (aqueous phase) ส่วน DPPH เกิดในขั้นตอนที่เป็นสารอินทรีย์ (organic phase)



รูปที่ 6 การทำ DPPH scavenging assay ที่ใช้ยับยั้งการเกิดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 50 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการทดสอบไซโอรีดอกซิน (Trx), โปรตีน rTrx_apo- α ^{PC} และโปรตีน rTrx_apo- β ^{PC} ด้วยการวัดค่า IC_{50} of scavenging activity.

(A)

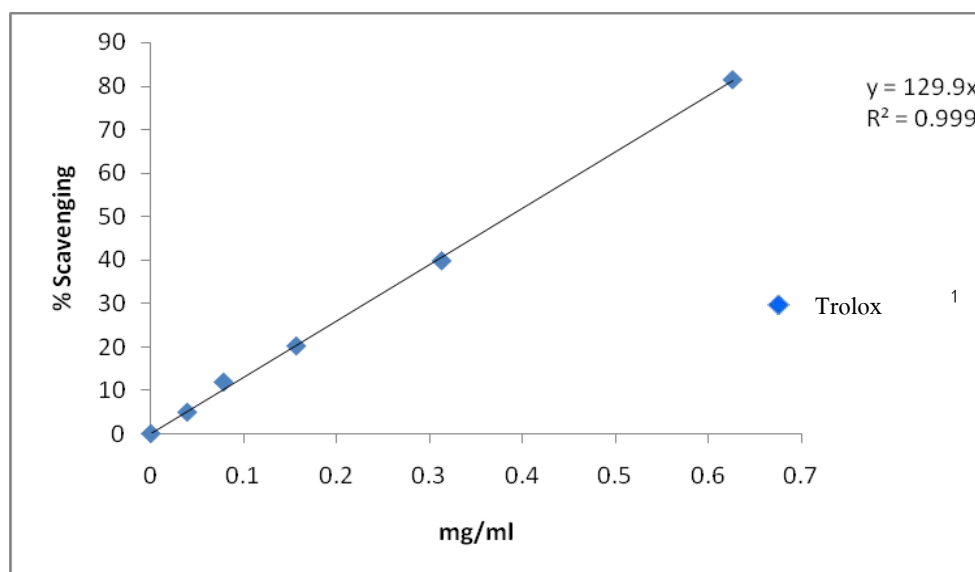


(B)

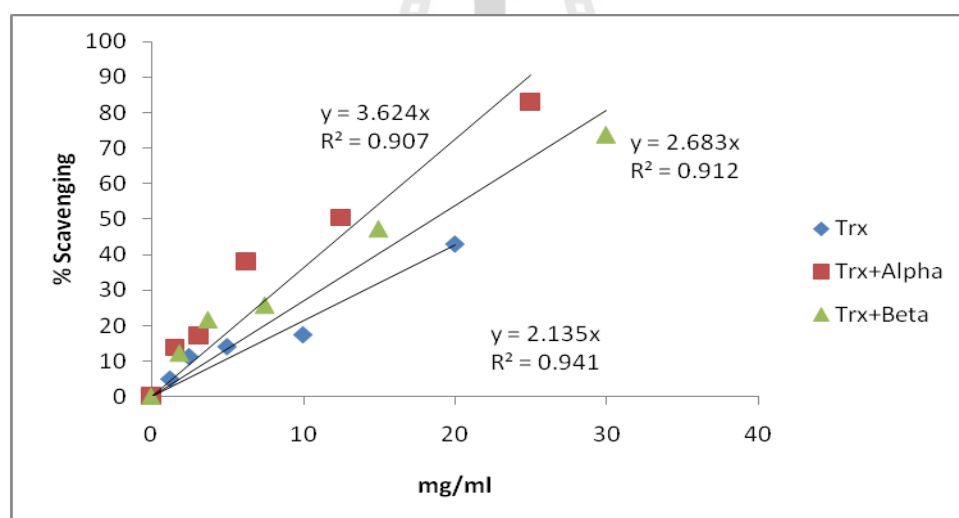


รูปที่ 7 ผลการทำปฏิกิริยา DPPH หลังจากเวลาผ่านไป 30 นาที เปรียบเทียบระหว่างตัวควบคุม (A) กรดแอสคอร์บิก และ (B) รีคอมบิแนนท์โปรตีน

(A)



(B)



รูปที่ 8 แสดงวิธีการทดสอบแบบ ABTS scavenging; (A): โทรลอคซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ; (B): โปรตีน

rTrx_apo- α^{PC} , rTrx_apo- β^{PC} และ Trx ที่ถูกทดสอบโดยวิธี ABTS และการวัดค่าของ IC_{50}

จากวิธีการทดสอบข้างต้นชี้ให้เห็นว่าโปรตีน rTrx_apo- α^{PC} และ rTrx_apo- β^{PC} พบคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อทดสอบด้วยวิธีการของ ABTS radical scavenging

ซึ่งสิ่งที่สำคัญของการทดสอบคุณสมบัติความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต้องเป็นขั้นตอนที่ง่าย ราคาไม่แพง ทดสอบได้อย่างรวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง (Thaipong และคณะ 2006) และเนื่องจากยังไม่มีวิธีการที่เป็นมาตรฐาน สำหรับการประเมินผลถึงปริมาณสูงสุดของสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น นักวิจัยหลายๆ กลุ่มจึงอาศัยการวิเคราะห์ในหลายๆ วิธี ซึ่งวิธีการต่างๆ ก็จะมีหลักการที่แตกต่าง และสภาวะการทดลองที่แตกต่างกันไป เพราะฉะนั้นคุณภาพของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้ก็จะแตกต่างกันไปตามแต่วิธีการนั้นๆ (Samec และคณะ 2009) ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้สนับสนุนความเป็นไปได้ที่ว่าไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliproteins) ที่เป็นไฟโคไซยานินอาจจะมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในการแพทย์ได้ และรีคอมบิแนนท์ ซี-ไฟโคไซยานิน อาจจะมีศักยภาพในการนำไปทำเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในอนาคตได้



บทที่ 4

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองนี้พบว่าการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของ *A. siamensis* TISTR8012 ด้วย phenol: chloroform: isoamylalcohol (25: 24: 1) ตามวิธีการของ Golden และคณะ (1988) จะทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูง ซึ่งถูกใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน *cpcA* และ *cpcB* ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบตามลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของ *Anabaena* 7120 biliprotein phycocyanin operon (X05239) ซึ่งยีนที่ได้ถูกนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และถูกบันทึกไว้เป็นฐานข้อมูลใน NCBI ด้วยเลขรหัส EU815327 และ EU815328

จากการศึกษาการแสดงออกของทั้งโปรตีน *cpcA* และ *cpcB* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนในเวกเตอร์เพื่อการแสดงออก pET32 คือ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ด้วยการกระตุ้นด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ และสภาวะที่เหมาะสมในการทำโปรตีนดังกล่าวบริสุทธิ์โดย วิธีโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพชนิดไอแมก คือ การชะโปรตีนที่ค่าความเข้มข้นของอิมิดาโซล 500 มิลลิโมลาร์ และจากการศึกษาคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging แสดงให้เห็นว่ามีเพียงกรดแอสคอร์บิกเท่านั้นที่แสดง scavenging activity โดยได้ค่า IC_{50} เป็น 193.80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับผลที่ได้จากวิธี ABTS radical scavenging แสดงค่า IC_{50} ของ ทรอลอกซ์ (ตัวควบคุม) โปรตีน rTrx_apo- α^{PC} และ โปรตีน rTrx_apo- β^{PC} เป็น 0.4, 13.8 และ 18.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

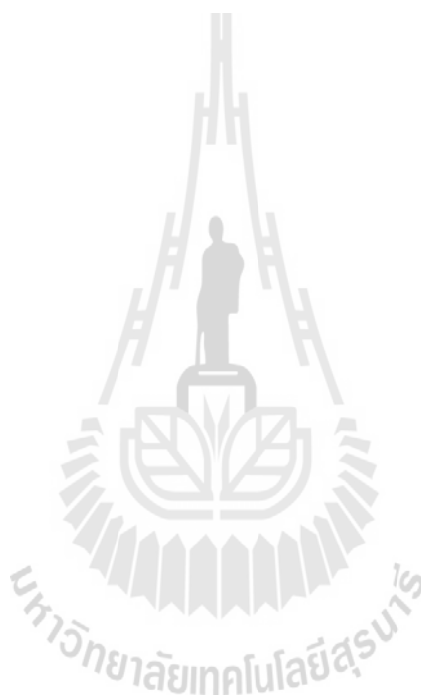
แม้รีคอมบิแนนท์โปรตีนแอลฟา และ บีตาที่ได้จากงานวิจัยนี้จะให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่สูงนัก แต่งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ทำการศึกษาการโคลน การบ่งชี้ชนิด และศึกษาการแสดงออกของยีนไฟโคไซยานิน *cpcA* และ *cpcB* จาก *Anabaena siamensis* เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ และเป็นข้อมูลให้กับงานวิจัยอื่นๆ ต่อไป

บรรณานุกรม

- Christa, L. C., Christopher, S. K., Pertti, J. V., and James, P. L. (2005). Analysis of cyanobacterial pigments and proteins by electrophoretic and chromatographic methods. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 382, 559–569.
- Golden, J. W., Carrasco, C. D., Mulligan, M. E., Schneider, G. J., and Haselkorn, R. (1988). Deletion of a 55-Kilobase-Pair DNA element from the chromosome during heterocyst differentiation of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. Journal of Bacteriology. 170, 5034-5041.
- Guan, X., Qin, S., Su, Z., Zhao, F., Ge, B., Li, F., and Tang, X. (2007). Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial holo- α -phycocyanin in *Escherichia coli* by using one expression vector. Applied Biochemistry Biotechnology. 142, 52-59.
- Guan, X. Y., Zhang, W. J., Zhang, X. W., Li, Y. X., Wang, J. F., Lin, H. Z., Tang, X. X., and Qin, S. (2009). A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant α -phycocyanin of *Spirulina*. Journal of Applied Microbiology. 106, 1093-1100.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S. (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. DNA Research. 8, 205–213.

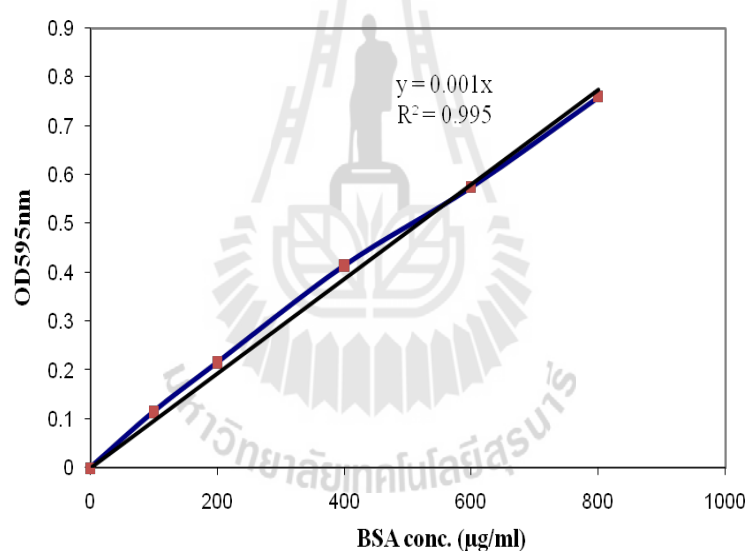
- Liu, L. N., Chen, X. L., Zhong, Y., and Zhou, B. C. (2005). Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae. Biochimica et Biophysica Acta. 1708, 133-142.
- Phunprunch, A., Baebprasert, W., Thongpeng, C., and Incharoensakdi, A. (2006). Nucleotide sequencing and transcriptional analysis of uptake hydrogenase genes in the filamentous N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*. Journal of Applied Phycology. 18, 713-722.
- Pilot, T. J., and Fox, J. L. (1984). Cloning and sequencing of the genes encoding the α and β subunit of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 81, 6983-6987.
- Rippka, R., Josette, D., John, B. W., Michael, H., and Roger, Y. S. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Journal of General Microbiology. 111, 1-61.
- Roman, Ch., Gonzalez, R., Ledon, N., Remirez, D., and Rimbau, V. (2003). C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. Current Protein and Peptide Science. 4, 207-216.
- Samec, D., Gruz, J., Strnad, D., Kosalec, I., Grubescic, R. J., Karlovic, K., and Lucic, A. (2010). Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (*Lamiaceae*) flower and leaf infusions (*Teucrium arduini* L. antioxidant capacity). Food and Chemical Toxicology 48, 113-119.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Luis, C-Z., and Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis. 19, 669-675.

- Tooley, A. J., Cai, Y. A., and Glazer, A. N. (2001). Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phyococyanin holo- α subunit in a heterologous host. Proceedings of the National Academy of Sciences. 98, 10560-10565.
- Yu, M. H., Glazer, A. N., and William, R. C. (1981). Cyanobacterial phycobilisomes. The Journal of Biological Chemistry. 256, 13130-13136.



ภาคผนวก ก

รูปผลการทดลอง



รูปที่ 9 แสดงค่ามาตรฐานโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

1. LB-LS medium (Luria-Bertani Low Salt medium)

	g/liter
distilled water	950 ml
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร หากต้องการเตรียมอาหารแข็งให้เติมวุ้นลงไป 12-15 กรัม จากนั้นนำไปต้มจนวุ้นละลายแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที รอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50°C แล้วค่อยเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) และกานาไมซิน (kanamycin) ลงไปให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันดี ก่อนนำไปใช้ (หากเป็นอาหารเหลว) หรือนำไปเท (หากเป็นอาหารแข็ง) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2. BG11 medium

ตารางที่ 3 ส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11

Component	Final Conc. (g/L)	1000X stock (g/100 ml)	Final stock	Stock no.
NaNO ₃	1.5	-	1.5 g	-
K ₂ HPO ₄	0.04	4.0	1.0 ml	Stock I
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075	7.5	1.0 ml	Stock II
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.036	3.6	1.0 ml	Stock III
Citric acid	6.56x10 ⁻³	0.656	1.0 ml	Stock IV
Fe(NH ₄) ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) ₂	6.0x10 ⁻³	0.6	1.0 ml	Stock V
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	1.04x10 ⁻³	0.104	1.0 ml	Stock VI
Na ₂ CO ₃	0.02	2.0	1.0 ml	Stock VII
A5 trace metal			1.0 ml	

ตารางที่ 4 ส่วนผสมของ A5 trace metal

Component	Final Conc. (g/L)	Final Stock
H ₃ BO ₃	-	2.36 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	-	1.31 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	0.22 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	79.0	1.0 ml
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	-	0.391 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	49.4	1.0 ml

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 โดยการละลาย K₂HPO₄ และ Fe(NH₄)₃(C₆H₅O₇)₂ ในน้ำกลั่น ปริมาตรอย่างละ 100 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมที่เหลือในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที แล้วรอให้เย็น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผสมส่วนผสมก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ลำดับ DNA ที่ส่งไปยังฐานข้อมูล NCBI

Anabaena siamensis TISTR 8012 phycocyanin beta subunit gene, complete cds

GenBank: EU815328.1

LOCUS EU815328 519 bp DNA linear BCT 20-JUL-2008
 DEFINITION Anabaena siamensis TISTR 8012 phycocyanin beta subunit gene, complete cds.
 ACCESSION EU815328
 VERSION EU815328.1 GI:194271298
 KEYWORDS .
 SOURCE Anabaena siamensis TISTR 8012
 ORGANISM *Anabaena siamensis* TISTR 8012
 Bacteria; Cyanobacteria; Nostocales; Nostocaceae; Anabaena.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 519)
 AUTHORS Suphap,W., Charoenrat,T. and Ketudat-Cairns,M.
 TITLE Expression of Anabaena siamensis TISTR 8012 Phycocyanin Beta Subunit
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 519)
 AUTHORS Suphap,W., Charoenrat,T. and Ketudat-Cairns,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-JUN-2008) School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, 111 University Ave., Nakhon Ratchasima 30000, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..519
 /organism="Anabaena siamensis TISTR 8012"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="TISTR 8012"
 /db_xref="taxon:213768"
 CDS 1..519
 /note="PCbeta-subunit"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="phycocyanin beta subunit"
 /protein_id="ACF37121.1"
 /db_xref="GI:194271299"
 /translation="MTLDVFTKVV SQADARGEFLSSEQIDALAAVVKEGNKRLDVVNR
 ITSNASAIVTNAARSLFEEQPQLIAPGGNAYTNRRMAACLRDMEIILRYVITYAALAGD
 ASVLDDRCLNGLRETYQALGTPGSSVAVGVQKMKEAAISIVNDPNGISKGDCSSLVSE
 VASYFDRAAAVG"
 ORIGIN
 1 atgacattag acgtatttac caaggttggt tctcaagcag acgctagagg cgaattcctg
 61 agcagcgaac aaatcgatgc ttggcagca gtagttaag aaggcaaca gcgtttggac
 121 gttgtaacc gcatcacaag caacgcttct gcgatcgta ccaacgctgc tcgttcttg
 181 ttgaagaac aacccagtt gattgctcct ggtggaacg cttacacca ccgtcgtatg
 241 gctgcttgct tacgcgacat ggaaatcatc ctgcgtacg ttacctacgc tgcattagct
 301 ggtgatgcta gtgttctaga cgaccgctgc ttgaacggtt tacgcgaaac ctaccaagca
 361 ttgggtactc ctggttcttc cgtagctggt gccgttcaaa aaatgaaaga agctgctatc
 421 agcattgtta acgatcccaa tggatcagc aaaggcgatt gctcttctct agtttctgaa
 481 gtagctagct acttgaccg cgctgctgct gttggttaa //

Anabaena siamensis TISTR 8012 phycocyanin alpha subunit gene, complete cds

GenBank: EU815327.1

LOCUS EU815327 492 bp DNA linear BCT 20-JUL-2008
 DEFINITION Anabaena siamensis TISTR 8012 phycocyanin alpha subunit gene,
 complete cds.
 ACCESSION EU815327
 VERSION EU815327.1 GI:194271296
 KEYWORDS .
 SOURCE Anabaena siamensis TISTR 8012
 ORGANISM **Anabaena siamensis TISTR 8012**
 Bacteria; Cyanobacteria; Nostocales; Nostocaceae; Anabaena.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 492)
 AUTHORS Suphap,W., Charoenrat,T. and Ketudat-Cairns,M.
 TITLE Expression of Anabaena siamensis TISTR 8012 Phycocyanin Alpha
 Subunit
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 492)
 AUTHORS Suphap,W., Charoenrat,T. and Ketudat-Cairns,M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-JUN-2008) School of Biotechnology, Suranaree
 University of Technology, 111 University Ave., Nakhon Ratchasima 30000, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..492
 /organism="Anabaena siamensis TISTR 8012"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="TISTR 8012"
 /db_xref="taxon:213768"
 CDS 1..492
 /note="PCalpha-subunit"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="phycocyanin alpha subunit"
 /protein_id="ACF37120.1"
 /db_xref="GI:194271297"
 /translation="MVKTPITEAIAAADTQGRFLSNTELQAARGRFDRAGDSLDAARV
 LTSKAQSLIDGATQAVYQKFPYTTSTPGNQFASDARGKAKCARDVGHYLRHIIAYSLVA
 GGTGPLDEYLIAGLAEINGAFDLSPSWYVEALKYIKANHGLSGQAANEANTYIDYAIN
 PLS"
 ORIGIN
 1 atgggttaaaa cccccattac cgaagctatt gcagctgctg ataccaagg acgtttctta
 61 agcaacaccg aattacaagc tgctagaggt cgtttgacc gcgctggtga cagcttagat
 121 gccgctcgcg tattgacctc caaggctcaa tccttgatcg acggtgcaac ccaagctgta
 181 taccaaaaagt tcccctacac cacctctacc cctggcaatc agtttgcttc tgatgcccg
 241 ggtaaagcta agtgtgctcg tgacgttggt cactacctcc gcatcatcgc ttacagcttg
 301 gttgctggtg gcaccggtcc ttggatgaa tacctaactg ctggttggc tgaaatcaac
 361 ggcgcatttg atttgtctcc cagctgttac gtagaagctc tgaagtacat caaggtaac
 421 catggcttga gcggtcaagc tgctaacgaa gctaacacct acatcgacta cgctatcaac
 481 cctctcagct ga

//

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง มารินา เกตุทัต-คาร์นส์
 (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Mariena Ketudat-Cairns
2. รหัสประจำตัวนักวิจัย 38 40 0999
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้
 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถ.มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี
 อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
 โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150
 e-mail: ketudat@sut.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
 พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) 3.24
 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 พ.ศ. 2538 Ph.D. (Biology) 4.00
 University of California, San Diego, USA
 พ.ศ. 2538 ประกาศนียบัตร Industrial Biotechnology
 Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Germany
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
 ☐ Molecular Biology & Genetic Engineering (Plant & Animal)
 ☐ Recombinant Protein Production
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ: ระบุสถานภาพในการทำการวิจัย
 ว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น
 - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี,
 - 7.2 ผู้ประสานงานชุดโครงการ การวิจัยโปรตีนแห่ง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
 - 7.3 หัวหน้าโครงการวิจัย : มีชื่อโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้
 - โมนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิ Y ของวัว
 - การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย รายงานฉบับนี้
 - การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากยีส SFR2 ในข้าว ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2555
 - การพัฒนาเครื่องหมายการตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากมทส ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2554
 - การค้นหาและการแสดงออกของกลุ่มยีน Glycosyl Hydrolases ในจีโนมของข้าวหอมมะลิ ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2555
 - การโคลนและผลิตเอนไซม์เอนเทอโรโคเนสสายสั้น ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2551

- การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเสนจากปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Thermostable DNA polymerase จาก *Pyrococcus furiosus* ใน
แบคทีเรีย *Escherichia coli* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
- การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในถังหมัก ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2549
- การแสดงออกและการผลิตเบต้ากลูโคซิเดส โดย *Pichia pastoris* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2548
- การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรม สรีระวิทยา และพฤติกรรมของไก่พื้นเมืองไทย
ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547
- การหาแผนที่ทางพันธุกรรมของไผ่ตง ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2546
- การพัฒนาวิธีการตรวจหาชนิดของโครโมโซมเพศปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2543
- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Taq DNA polymerase ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2541

ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ แมว และสัตว์ป่าใกล้สูญพันธุ์ โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ
- Investigation of Rice Beta-Glycosidase Gene Functions.
- (National Science and Technology Development Agency National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2545
- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque (NIH, USA) แล้วเสร็จ 2537

7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

ดูหัวข้อ 7.3

7.5 งานวิจัยที่กำลังทำ :

- โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อสุจิ Y ของวัว

สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2552 และได้ดำเนินการไปแล้ว 80%

Publications:

- Srirattana K, , Imsoonthornruksa S., Laowtammathron C, Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns M, Parnpai, R. (2012). Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of Trichostatin A treatment Cellular Reprogramming
- Imsoonthornruksa, S., A. Sangmalee, K. Srirattana, , R. Parnpai, **M. Ketudat-Cairns** (2011) Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring Cellular Reprogramming 14(1): 79-87
- Songwattana, P. and **Ketudat-Cairns, M.** (2011) Comparison between Serological and Molecular Detection of Citrus Canker Pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) Molecular Pathogens 2(3) 1-7 doi: 10.5376/mp.2011.02.0003
- Ruamkuson, D., Tongpim, S., and **Ketudat-Cairns, M.** (2011) A Model to develop biological probes from microflora to assure traceability of tilapia Food Control 22: 1742-1747
- Rattanasuk, S., Parnpai, R., and **Ketudat-Cairns, M.** (2011) Multiplex Polymerase Chain Reaction used for Bovine Embryo Sex Determination J of Reprod and Dev 57(4) 539-542

- Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, T. Nakai, R. Parnpai (2011) The effects of manipulation medium, culture system and recipient cytoplasm on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos J Reprod Dev 57(3) 385-392
- Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., Parnpai, R., **Ketudat-Cairns, M.** (2011) A simple method for production and purification of soluble and biologically active recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*, Journal of Biotechnology (151): 295-302
- Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, R. Parnpai (2010) Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos Reprod Fertil Dev 22(4): 613-24
- Srirattana K, Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Imsoonthornruksa S, **Ketudat-Cairns M**, Phermthai T, Nagai T, Parnpai R (2010). Effect of Donor Cell Types on Developmental Potential of Cattle (*Bos taurus*) and Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cloned Embryos J Reprod Dev 56(1): 49-54.
- Ruamkusol, D., and Ketudat-Cairns, M. (2009) Optimum Conditions for DGGE of 16S rDNA from SUT Tilapia Intestinal Microflora Suranaree J. Aci Technol 16 (4)
- Rattanasuk, S., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Genetic Diversity of Felids' Cytochrome B Suranaree J. Aci Technol 16 (4)
- Kupradit, C., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) The extraction and purification of boar sperm surface protein Suranaree J. Aci Technol 16 (3) 245-251
- Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, M. Ketudat-Cairns, R. Parnpai (2009) Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos Reprod, Fert and Dev (accepted Oct 2009)
- Srirattana K, Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Imsoonthornruksa S, **Ketudat-Cairns M**, Phermthai T, Nagai T, Parnpai R (2009). Effect of Donor Cell Types on Developmental Potential of Cattle (*Bos taurus*) and Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cloned Embryos J Reprod Dev doi:10.1262/jrd.09-135A
- Rattanasuk, S. and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Chryseobacterium indologenes, novel mannanase producing bacteria, Songklanakarin Jo. of Sci and Tech 31(4) 395-399
- Kupradit, C., Charoenrat, T., and **Ketudat-Cairns, M.** (2008) Recombinant Bovine Enterokinase Light Chain Production by *Pichia pastoris*: Effect of Induction Temperature Thai Journal of Biotechnology 8 (1) 99-105
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A. W. S., **Ketudat-Cairns, M.** and Parnpai, R. (2008) Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocyte J of Reprod and Dev accepted May 19th 2008
- Phetsom, J., Jung, K., **Ketudat-Cairns, M.**, and Ronald, P. (2007). Quality assessment of NSF Rice Oligonucleotide Array. Agricultural Sci. J. 38(6): 11-14.
- Opasiri R., Pomthong B., Akiyama T., Nakphaichit M., Onkoksoong T, **Ketudat-Cairns M**, and Ketudat Cairns JR. (2007) A stress-induced rice beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain Biochem. J. Immediate Publication, doi:10.1042/BJ20070734 16 August 2007
- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya N. Laowtammathron, C., **Ketudat-Cairns, M.** and Parnpai, R. 2006. Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos. Reproduction, Fertility and Development 19(1) 141
- Lorthongpanich, C., K. Srirattana, S. Imsoonthornruksa, N. Sripunya, C. Laowtammathron, O. Kumpung, **M. Ketudat-Cairns** and R. Parnpai (2007) Expression and Distribution of Oct-4

- in Interspecies-Cloned Long- Tailed Monkey (*Macaca fascicularis*) Embryo Reproduction, Fertility and Development 19(1) 149 doi:10.1071/RDv19n1Ab62
- Muenthaisong S, Laowtammathron C, **Ketudat-Cairns, M.**, Parnpai R, Hochi S. (2007) Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. *Theriogenology*. 67(4) 893-900
- Toonkool, P., Metheenukul, P., Sujiwattanasat, P., Paiboon, P., Tongtubtim, N., **Ketudat-Cairns, M.**, Ketudat-Cairns, J., and Svasti, J. (2006) Expression and purification of daltocinase, a *b*-glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. *Protein Expression and Purification* (in press)
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Jahic M., Veide, A., and Enfors, S.-O., (2006) Increase total air pressure versus oxygen limitation for enhance oxygen transfer and production formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process *Biochemical Engineering Journal*. 30: 205-211.
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Enfors, S.-O., Jahic M., and Veide, A. (2006) Recovery of Recombinant β -glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high cell density culture broth. *Journal of Biotechnology* (122) 86-98
- Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns M.**, Stendahl-Andersen, H., Jahic M., and Enfors S.-O (2005) Oxygen limited fed-batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. *Bioprocess and Biosystems Engineering* (27) 399-406 ** *Received Best paper of the year award.* **
- Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., **Ketudat-Cairns, M.**, Hochi, S., Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: the effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in culture medium, and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology* (64), 1185-1196
- Charoenrat, T., Vanichsrirattana, V., and **Ketudat-Cairns, M.** (2004) Recombinant β -glucosidase Production by *Pichia pastoris*: Influence of pH. *Thai Journal of Biotechnology* 5 (1) 51-55
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Likitdecharote, B. and Parnpai, R. (2004). *In vitro* development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Reprod. Fert. Dev.* (16): 149.
- Kanchanatawee, S., Wanapu, C. and **Ketudat-Cairns, M.** (2000) *Biotechnology Graduate Education in Thailand*. *Thai J. of Biot* 2 (1): 55-62
- Carlini, L.E., **M. Ketudat**, R.L. Parsons, S. Prabhakar, R. J. Schmidt and M. J. Guiltinan (1999) The maize bZIP protein orthologue of EmBP-1: Activation of gene expression in yeast from an O2 box and localization of a bipartite nuclear localization signal (NLS). *Plant Molec. Biol.*41: 339-349. (M. Ketudat and L. Carlini are Co-first authors)
- Ketudat-Cairns, M.** (1998) *Biotechnology and Daily Life*. Suranaree J. Sci Technol 5:208-211
- Manakasem Y., Sornsuk P., and **Ketudat-Cairns M.** (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. *Suranaree J. Sci Technol* 5:95-100
- Schmidt, R. J., Pysh, L. D., **Ketudat, M.**, Parsons, R. L., and Hoschek, G. (1994) bZIP Proteins Regulating Gene Expression in Maize Endosperm. In *Molecular Genetic Analysis of Plant Metabolism and Development* (G. Coruzzi and P. Puigdomenech, eds.) NATO ASI Proceedings
- Schmidt, R. J., **Ketudat, M.**, Aukerman, M. J., and Hoschek, G. (1992) Opaque-2 is a Transcriptional Activator that Recognizes a Specific Target Site in 22-kD Zein Genes. *Plant Cell* 4:689-700
- Ueda T, Wawerczak W, Ward K, Sher N, **Ketudat M**, Schmidt RJ, Messing J. (1992) Mutations of the 22- and 27-kD zein promoters affect transactivation by the Opaque-2 protein. *Plant Cell* 4:701-709